



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise da Segregação Genética do Cruzamento entre
Phaseolus vulgaris e *Phaseolus acutifolius* por meio de
Marcadores Moleculares e Bioquímicos**

Miriam Gisele Gasparotto

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

**Uberlândia – MG
Junho – 1998**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise da Segregação Genética do Cruzamento entre
Phaseolus vulgaris e *Phaseolus acutifolius* por meio de
Marcadores Moleculares e Bioquímicos**

Miriam Gisele Gasparotto

Prof. Ph.D Luiz Ricardo Goulart Filho
(Orientador)

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

**Uberlândia – MG
Junho – 1998**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise da Segregação Genética do Cruzamento entre *Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus acutifolius* por meio de Marcadores Moleculares e Bioquímicos

Miriam Gisele Gasparotto

Aprovada pela banca examinadora em __/__/1998

Nota: _____

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
(Orientador)

Prof. M.Sc Gismar Silva Vieira
(Co-orientador)

Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr
(Co-orientador)

Uberlândia, 25 de Junho de 1998

Ao meu noivo Marcos,

*Que durante todos esses anos, apesar da
distância, estive ao meu lado
compartilhando problemas, respeitando
minhas limitações e aceitando minha
ausência. A quem devo grande parte das
minhas conquistas e realizações.*

Com muito amor, dedico este trabalho

“Necessitamos de biólogos que nos digam o que podemos e devemos fazer para sobreviver e o que não devemos fazer, se esperarmos manter e melhorar a qualidade de vida. O destino do mundo depende da integração, preservação e extensão do conhecimento que possui um número reduzido de homens, que somente agora começam a se dar conta do poder desproporcionado que possuem e quão enorme é a tarefa a realizar.”

Potter

agradecimentos especiais

Ao meu orientador Luiz,

*Que me sempre incentivou acreditando na minha
capacidade, dando total liberdade para a busca de
novos conhecimentos, que apesar do pouco tempo
disponível, sempre esteve pronto para me atender e
ajudar .*

A quem tenho grande admiração.

Aos meus pais,

*Que mesmo sem conhecer este universo ao
qual faço parte hoje, orgulharam-se do meu
trabalho, ajudando-me superar dificuldades
com suas orações e apoiando-me nas minhas
escolhas. Com todo respeito e carinho.*

agradecimentos

Agradeço à Deus,

Pela vida, pela coragem, pelas realizações e pelas pessoas que até então cruzaram o meu caminho, e que de qualquer maneira ajudaram-me subir os degraus rumo à conquista dos meus objetivos.

Ao meu co-orientador Gismar,

Pela paciência e atenção dispensada, o que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Warwick Estevam Kerr,

Pelo simples exemplo de vida e de trabalho que nos passa, fazendo-nos acreditar que o sucesso pessoal e profissional estão na busca de novos conhecimentos.

Ao meu irmão Júnior e minha cunhada Kristiane,

Pelo apoio, e reconhecimento da importância dessa conquista.

À minha irmã Bia,

Pela sinceridade de suas atitudes, e o carinho com que me recebeu à cada volta.

As minhas “irmãs” Andréia, Beatriz e Cristiane,

Pela amizade, companheirismo e presença. Pelos momentos difíceis e maravilhosos que passamos juntas, os quais jamais esquecerei.

Aos meus queridos amigos Gilberto, Isa, e Ricardo

Pela confiança e amizade sincera que me dedicaram com tanto carinho.

Aos meus amigos Warlei e Marcelo,

Que sempre me ajudaram, seja pelas discussões científicas, ou pela realização de tarefas, a quem devo muita admiração e amizade.

Aos amigos do laboratório: Mauricio, Vivian, Elizângela, Bárbara, Graciele, Waldesse, Rosana, Luciano, Kátia, Wanessa, Leonardo, André, Walter, Juliana, Wânia, Frederico, Ana Cândida, Ana Luíza, Adriana, Soraya e Cristiane, pela amizade e momentos felizes, os quais deixarão muitas saudades.

À 41ª turma de Ciência Biológicas,

Cristiane, Lisandra, Adriana, Katiere, Paula, Marta, Renato, Cristiana, Juliana, Évelin, Ronaldo e Luciana.

À Universidade Federal de Uberlândia,

Pelas oportunidades, e formação profissional aqui adquirida.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – A Cultura.....	1
1.2 – Genética.....	2
1.3 – Cruzamentos Interspecíficos.....	3
1.4 – Marcadores Bioquímicos e Moleculares.....	5
2 – OBJETIVOS.....	9
2.1 – Geral.....	9
2.2 – Específico.....	9
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 – Material Biológico.....	10
3.2 – Análise Bioquímica.....	11
3.2.1 – Extração de Proteínas.....	11
3.2.1.1 – Faseolina.....	11
3.2.1.2 – Proteínas Solúveis em NaCl 0,5 M.....	12
3.2.2 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	12
3.3 – Análise Molecular.....	13
3.3.1 – Extração de DNA.....	13
3.3.2 – Dosagem do DNA em Espectrofotômetro.....	14
3.3.3 – Amplificação do DNA via PCR pela Técnica RAPD.....	14
3.3.4 – Eletroforese em Gel de Agarose e Visualização.....	15
3.4 – Estudos de Ligação por Análise Bioquímica e Molecular.....	15
4 – RESULTADOS.....	16
4.1 – Faseolina.....	16
4.2 – Proteínas Solúveis em NaCl 0,5 M.....	16
4.3 – Marcadores Moleculares RAPD.....	19
4.4 – Estudos de Ligação.....	21
4.5 – Distância Genéticas.....	21

5 – DISCUSSÕES.....	24
5.1 – Faseolina.....	24
5.2 – Proteínas Solúveis em NaCl 0,5 M.....	24
5.3 – Marcadores Moleculares.....	27
5.4 – Estudos de Ligação.....	28
5.5 – Distância Genéticas.....	29
6 – CONCLUSÃO.....	31
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
8 – ANEXO.....	37

RESUMO

O feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, representa importante fonte de proteínas para a maioria da população de países subdesenvolvidos e de baixa renda. Visando essa importância na alimentação humana, programas de melhoramento recorrem à cruzamentos entre espécies para a obtenção de cultivares mais adaptadas à região de cultivo.

O feijão-tepari, *Phaseolus acutifolius*, é reconhecido como importante fonte de resistência a seca, sendo portanto um excelente genótipo para cruzamentos interespecíficos com *P. vulgaris*.

O monitoramento do melhoramento clássico pela genética molecular pode reduzir gastos e ganhar tempo até o lançamento de novas cultivares.

Com a intenção de avaliar a recombinação genética do cruzamento entre *P. vulgaris*, cultivar Ica Pijão e *P. acutifolius*, cultivar GL-0441, seguidos de dois retrocruzamentos com o pai recorrente *P. vulgaris*, avaliou-se as segregações gênicas em 39 indivíduos da progênie resultante R_2C_1 .

Os resultados indicaram que uma autofecundação em R_1C_1 pode ter ocorrido, e que possíveis falhas de pareamento e complexas interações gênicas ou cromossômicas estejam alterando a proporção esperada 3:1 de homozigotos : heterozigotos.

Dois grupos de ligação foram construídos a partir dos marcadores bioquímicos e moleculares, por este mapa foi identificado ocorrência de recombinação gênica entre ambas espécies.

1. INTRODUÇÃO

1. 1. A Cultura

A cultura do feijoeiro, é de fundamental importância para o suprimento alimentar de grande parte da população mundial, principalmente em países subdesenvolvidos e de baixa renda, da América Latina e África, onde representa principal fonte protéica.

O feijão é o 4º produto em área plantada, e o 6º em valor da produção agrícola no Brasil. Sua importância social, como alimento substituto de proteínas animais, e o consumo generalizado pela população brasileira, justifica o esforço de pesquisa no sentido de obter melhores níveis de produtividade e garantia do abastecimento interno do produto (TEIXEIRA & ROCHA, 1988).

Doenças, pragas e deficiências nutricionais limitam fortemente a estabilização e a produtividade das variedades de feijão existentes. Embora um progresso substancial tem sido observado, existem dificuldades impostas à pesquisa que limitam a nossa habilidade de resolver alguns dos principais problemas na produção de feijão. Dentre eles, a quebra de tolerância e ou resistência.

A criação de novos cultivares, visando potencial produtivo elevado e adaptabilidade climática, é um dos principais componentes da estrutura de produção do feijão. A tecnologia gerada através destes processos, envolvendo anos de pesquisa e vastos recursos financeiros, precisa ser levada ao agricultor, o que só poderá ser feito por meio da semente (VIEIRA, 1988).

A variabilidade genética existente na natureza fornece elementos que possibilitam a melhoria e a adaptação de uma determinada espécie a um determinado ambiente. Sendo amplamente utilizada no melhoramento genético, ela é a base na qual se fundamenta o trabalho de criação de novos cultivares (VIEIRA, 1988).

1. 2. Genética

Segundo Burkart (1952), o gênero *Phaseolus* é composto por aproximadamente 180 espécies, distribuídas nas zonas quentes de ambos hemisférios, mas com predominância nas Américas, sendo a maioria diplóides ($2n=22$), de reprodução autogâmica, havendo raras exceções. Portanto, a presença de diversas espécies silvestres e a ampla distribuição geográfica que possui, o torna uma planta modelo para estudos de transferência genética, expressão gênica, comportamento do genoma, mapeamento genético e evolução.

A espécie mais cultivada do gênero *Phaseolus*, é o feijão comum *Phaseolus vulgaris*, amplamente distribuído e utilizado, além de sua importância social, possui características como ploidia e ciclo curto, que o torna, excelente base para o fluxo gênico com outras espécies.

O *P. vulgaris*, em geral não se adapta aos trópicos úmidos, mas cresce bem em áreas com chuvas regulares, desde os trópicos até as zonas temperadas. É muito sensível tanto às geadas quanto às altas temperaturas. Condições de seca durante as épocas críticas do florescimento ao enchimento da vagem, são também muito prejudiciais. Da mesma maneira, o excesso de chuva causa a queda de flores e aumenta a ocorrência de enfermidades (ZIMMERMANN & TEIXEIRA, 1988).

O feijão-tepari (*Phaseolus acutifolius*), tem distribuição limitada, e é cultivado com alguma intensidade nas áreas do Sudoeste da América do Norte. Verifica-se na literatura, que esta espécie tem uma resistência considerável à seca, e caracteriza-se por apresentar folhas e sementes pequenas e rendimentos muito baixo, mesmo sob condições favoráveis, quando comparada com o feijoeiro comum (*P. vulgaris*) - (ZIMMERMANN & TEIXEIRA, 1988).

1. 3. Cruzamentos Interespecíficos

A exploração de espécies afins de plantas cultivadas é uma das maneiras de se introduzir genes adicionais em variedades cultivadas. A hibridação é um importante instrumento para o melhoramento de espécies de plantas cultivadas. A variabilidade pode ser obtida tanto por meio da hibridação intervarietal (métodos convencionais), quanto entre diferentes gêneros (intergenéricas), ou entre diferentes espécies (interespecíficas) (PRESTES & GOULART, 1995).

Os cruzamentos de *P. vulgaris* com *P. acutifolius*, apresentam resultados ricos em informações genéticas para fins agronômicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares. Do ponto de vista básico, estas informações têm sido utilizadas para especulações da origem, isolamento geográfico, compatibilidade de cruzamento e outros, e são aplicados diretamente na orientação em programas de melhoramento.

Segundo Mejia-Jiménez *et al.* (1994), o sucesso nas transferências de genes da maioria das características de interesse de tepari para feijão comum, tem sido poucas vezes realizadas, e entre as causas para esse limitado sucesso inclui: uso de poucos genótipos de ambas espécies para hibridação; ocorrência de híbridos F1 letais, associados a certos genótipos de ambas espécies; ocorrência de aborto do embrião; esterilidade do híbrido e avaliação inadequada da progênie híbrida interespecífica.

A realização de cruzamentos entre espécies do gênero *Phaseolus*, tem sido usado como alternativa para incorporar ao feijão comum (*P. vulgaris*) determinadas características agronômicas importantes, como resistência a doenças e pragas e resistência a seca, que estão presentes nas demais espécies cultivadas do gênero. Sobre outro aspecto a realização de tais cruzamentos, serve para estudar a relação evolutiva entre espécies (SMARTT, 1970).

Crocomo & Cabral (1985) destacaram a espécie *P. acutifolius* como uma importante fonte de tolerância ao estresse hídrico e térmico, e resistente à algumas doenças. Thomas & Waines (1984) relataram a importância da espécie em hibridação interespecífica com *P. vulgaris*, como fonte de tolerância ao estresse hídrico e a altas temperaturas.

Variedades de plantas de mesma espécie, hibridizam-se facilmente, mas conforme aumenta-se a distância genética entre os envolvidos, aumenta-se as

dificuldades de sucesso na hibridação. As tentativas de transferência de característica para o feijão comum por hibridação interespecífica, não têm sido bem sucedidas, devido aos diferentes níveis de incompatibilidade (CIAT, 1990).

Guo *et al.* (1989) citam o melhor desempenho de híbridos resultantes de retrocruzamentos entre *Phaseolus coccineus* e *P. vulgaris*, quando este último foi usado como pai recorrente. Da mesma forma, Mejía-Jiménez *et al.*, (1994), relatam ser gradativamente dispensável o uso de cultura de embriões, para resgatar híbridos entre *P. vulgaris* e *P. acutifolius*, a medida que retrocruzamentos com *P. vulgaris* recorrente eram realizados.

O principal procedimento para a transferência direta de genes é por meio da manipulação sexual. Após a produção de híbridos faz-se o retrocruzamento com o genitores de caracteres desejáveis (GOULART, 1990).

O método de retrocruzamento, é freqüentemente empregado em cruzamentos divergentes, visando elevar a frequência de genes favoráveis na população. Ele pode também ser aplicado na adaptação de germoplasma exótico, reduzindo sua contribuição genética na formação de populações segregantes.

Mejia-Jiménez *et al.* (1994), citam que problemas com esterilidade do híbrido F1, poderiam ser vencidos parcialmente pelo retrocruzamento recorrente com feijão comum, mas isso reduz a possibilidade de reter genes de interesse do tepari.

O comportamento citogenético, pode muitas vezes estar associado à viabilidade do híbrido, onde o pareamento entre cromossomos é consequência da uma complexa interação entre genes. Este pareamento é essencial para o sucesso de cruzamentos interespecíficos (PRESTES & GOULART, 1995).

Os efeitos deletérios dos genes envolvidos em cruzamentos entre indivíduos que não pertençam à mesma espécie, podem ser eliminados se os cromossomos forem homólogos, pois há recombinação, entretanto se os cromossomos forem homeólogos ou não homólogos, tais efeitos tornam-se difíceis de serem eliminados (PRESTES & GOULART, 1995).

A expansão da base hereditária e a identificação e transferência desses caracteres importantes de fontes primárias e secundárias de genes, são alguns dos desafios que devem ser resolvidos (CIAT, 1990). Porém, muitas das limitações apresentadas à pesquisa não podem ser resolvidas pela pesquisa convencional,

exigindo assim, a aplicação de técnicas mais avançadas da biotecnologia (GOULART, 1996).

1. 4. Marcadores Bioquímicos e Moleculares

Os marcadores bioquímicos obtidos sejam por uma reação enzimática diferenciada entre indivíduos, ou por uma proteína constitutiva polimórfica, são caracteres de interesse em estudo de genética e evolução como: estudos de diversidade genética, estudos de ligação associadas a características importantes e outros. Dessa forma, os marcadores bioquímicos, juntamente com outros têm contribuído para elucidação de vários estudos genéticos (VIEIRA, 1997).

O centro de origem do feijoeiro comum (*P. vulgaris*) e do feijão-tepari (*P. acutifolius*) é conhecido como Mesoamericano, compreendendo o sul do México, e América Central (VIEIRA, 1967). Os primeiros autores a estudarem os centros de origem do feijão, basearam-se em características morfológicas distintas e comuns observadas nas plantas. A partir da década de 70, o uso de marcadores bioquímicos começa a ser utilizado, adicionando informações para diferenciar os centros de origem de cultivares e espécies do gênero *Phaseolus*.

A faseolina está diretamente envolvida com o centro de origem no gênero *Phaseolus*. Dois centros conhecidos, denominados mesoamericano e andino, para os quais há um padrão de faseolina conhecido e distinguível.

A faseolina é um marcador bioquímico bastante utilizado nos estudos genéticos em feijoeiro comum. Ela é a principal proteína de reserva da semente de feijoeiro comum, e representa 36-46% do total de proteína da semente (MA & BLISS, 1978).

Estudos genéticos envolvendo cruzamentos, mostraram que os genes que codificam os diferentes polipeptídeos componentes da faseolina estão intimamente ligados, formando um bloco gênico, que é herdado em caráter de herança simples (ROMERO *et al.*, 1975)

A biologia molecular tem sido uma ótima ferramenta para estudos de diversidade genética. Informações sobre o parentesco ou a similaridade genética entre cultivares dentro de um banco de germoplasma, tem aplicações importantes no melhoramento de plantas (THOMANN, *et al.* 1993).

A tecnologia da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), surgiu na década de 80, e sua concepção causou uma verdadeira revolução na biologia. A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, a torna poderosa para estudos genéticos moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo.

A PCR é caracterizada por um ciclo de 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla de DNA alvo é desnaturada, a seguir ocorre o anelamento de *primers*, e por final, a enzima DNA polimerase sintetiza nova fita, pela adição de nucleotídeos. Este ciclo é repetido muitas vezes de forma a produzir o DNA alvo em progressão geométrica.

A partir de 1990, uma nova técnica PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), foi desenvolvida com a ideia de se utilizar *primers* curtos (10 pb), de sequência arbitrária (WILLIAMS, *et al.*, 1990). A principal vantagem da técnica PCR-RAPD é a de não requerer informações genéticas prévias da sequência de DNA (TINGEY, *et al.*, 1992).

Além dessa importante característica, Williams, *et al.*, (1990), em seu trabalho destacam como grandes vantagens a rapidez e simplicidade da técnica, e a utilização de quantidades mínimas de DNA necessárias para análise genômica de um indivíduo.

Uma característica da técnica PCR-RAPD, é o fato de se comportarem como marcadores genéticos dominantes, isto é, o indivíduo heterozigoto não é diferenciado do homozigoto dominante para amplificação. É usada em uma variedade de aplicações incluindo: construção de mapas genéticos, estabelecimento de relacionamentos filogenéticos, análise de estrutura e diversidade genética em populações, obtenção de *fingerprints*, marcas moleculares associadas a genes de interesse.

Os marcadores moleculares são aplicados em programas de melhoramento para: reduzir o número de retrocruzamentos, e ou cruzamentos dialélicos, ligações a genes de resistência, controle de qualidade por *fingerprints*, incorporação de genes, e monitoração a introduções de genes de plantas silvestres. A utilização de marcadores moleculares apresenta várias vantagens sobre marcadores morfológicos convencionais, tais como: exibem neutralidade fenotípica sem influência ambiental; são herdados em dominância e codominância, raramente

exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, podendo ser detectado tanto em tecidos jovens como adultos, apresentam resultados positivos quanto ao melhoramento de características quantitativas (BECKMAM & SOLLER, 1983).

A técnica RAPD utiliza um *primer*, e este tem sequência arbitrária de nucleotídeos. Os marcadores comportam-se com dominância, havendo a possibilidade de se comportarem com codominância (indivíduos $2n$). Os marcadores RAPD apresentam-se de maneira muito eficiente no mapeamento de polimorfismo ligados a locos de resistência a doenças (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Os marcadores moleculares podem maximizar a eficiência dos programas de retrocruzamentos, aumentando a probabilidade de conversão dos indivíduos e reduzindo o tempo requerido para obter uma recuperação aceitável do progenitor recorrente (BORÉM, 1997). Diversas aplicações de marcadores moleculares em melhoramento genético podem ser distribuídas em aplicações cujos resultados apresentam expectativas de curto, médio e longo prazo. (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

A proporção do genoma que pode ser monitorada com marcadores moleculares é em função do seu número e da sua distribuição no genoma. Para as espécies que dispõem de mapas com marcadores que saturam o genoma em intervalos menores que 20 cM seria teoricamente possível selecionar um indivíduo praticamente idêntico ao genitor recorrente com a avaliação de grande número de progênies da primeira geração de retrocruzamentos (BORÉM, 1997).

As aplicações de curto prazo envolvem basicamente, a identificação e discriminação de genótipos. Nas aplicações de médio-longo prazo, os marcadores permitem quantificar a variabilidade genética ao nível de sequência de DNA e correlacioná-la com a expressão fenotípica em procedimentos de mapeamento genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

A análise genética ao nível de DNA está se tornando cada vez mais eficiente. Com isso, uma grande quantidade de informações sobre genomas de plantas cultivadas estão sendo geradas. As perspectivas são de que as próximas décadas assistirão a uma explosão deste conhecimento, abrindo inúmeras oportunidades para a exploração mais eficiente da variabilidade genética existente tanto nas variedades cultivadas como no germoplasma silvestre. Hoje, a identificação e localização de genes de importância econômica é um objetivo atingível não somente

nas culturas tradicionais mais estudadas e manipuladas geneticamente, mas também em espécies essencialmente não domesticadas de hábito como florestais e frutíferas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

2. OBJETIVOS

2. 1. Geral

- Analisar da segregação gênica resultante do cruzamento entre as espécies *Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus acutifolius*.

2. 2. Específico

- Determinar a divergência genética entre as espécies *Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus acutifolius*, e caracterizá-la bioquímica e molecularmente;
- Realizar estudos de ligação entre os marcadores bioquímicos e moleculares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular, pertencente ao Departamento de Genética e Bioquímica, da Universidade Federal de Uberlândia, no período de junho de 1997 a junho de 1998.

3. 1. Material Biológico

Para a realização deste trabalho, foram obtidas junto ao CNPAF (Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, Goiânia – GO), sementes de *Phaseolus vulgaris* (Feijão comum), cultivar Ica Pijão, *Phaseolus acutifolius* (Feijão-tepari), Série GL-0441, e uma progênie de 39 híbridos resultante de dois retrocruzamentos entre as espécies, onde a espécie *P. vulgaris* foi utilizada como genitor recorrente, e *P. acutifolius* como genitor doador (Tabela 1).

As sementes dos genitores e a progênie R₂C₁ foram divididas em dois lotes com duas sementes cada, sendo um deles usado para análise eletroforética das frações protéicas e o outro plantado em casa de vegetação, para o desenvolvimento das plantas e obtenção de folhas para extrações de DNA.

Tabela 1. Relação das espécies e híbridos analisados

Genitores			
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Ica Pijão		
<i>Phaseolus acutifolius</i>	GL-0441		
Progênie R ₂ C ₁			
3262	3312	10867	10881
3267	10858	10868	10882
3272	10859	10869	10883
3277	10860	10871	10884
3282	10861	10872	10885
3287	10862	10874	10886
3292	10863	10875	10888
3297	10864	10877	10889
3302	10865	10878	10890
3307	10866	10880	

3. 2. Análise Bioquímica

3. 2. 1. Extração de Proteínas

A princípio retirou-se o tegumento e o embrião das sementes, os cotilédones foram então macerados em gral de porcelana até a formação de um pó fino, que foi transferido a tubos de eppendorff, para a realização da extração das frações protéicas. Estas foram armazenadas em freezer -80°C para posterior análise eletroforética.

3. 2. 1. 1. Faseolina

O procedimento para a extração de faseolina, foi segundo o protocolo descrito por Romero *et al.* (1975), com modificações no tempo de extração. Foi adicionado a 60 mg de macerado, 1,2 ml de solução de extração (NaCl 0,5 M, ácido ascórbico 0,25 M, pH 2,4). O extrato permaneceu em agitação constante por uma hora,

protegido de luminosidade, para a extração da proteína, em seguida foi centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e a ele adicionado 5x seu volume de água desionizada gelada (padronizou-se a retirada de 250 µl do volume total do sobrenadante para que a extração fosse realizada em microtubos de 1,5 ml). Esta etapa foi repetida por duas vezes para a eliminação do ácido ascórbico, e o precipitado final obtido foi solubilizado em 250 µl de NaCl 0,5 M.

3. 2. 1. 2. Proteínas Solúveis em NaCl 0,5 M

As proteínas foram extraídas de acordo com o protocolo descrito por Echeverrigaray *et al.* (1993). Junto a 20 mg de macerado foi adicionado 200 µl de solução NaCl 0,5 M, e mantido sob agitação constante, a 4°C. O extrato foi então centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos, e o sobrenadante recolhido.

3. 2. 2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras de proteínas foram desnaturadas e dissociadas em seus constituintes peptídeos, por aquecimento a 100°C por 5 minutos em presença de tampão da amostra 2X SDS *buffer* (0,125 M Tris-HCl, pH = 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10 %), (LAEMMLI, 1970).

As subunidades foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970) na concentração de 10%. As dimensões dos géis foram de 16 cm x 17 cm x 0,75mm.

Como solução tampão, para a corrida eletroforética, foi utilizado Trizma base 0,1M; EDTA 7,8 mM; glicina 0,77 M e SDS 0,3% pH 8,3.

As eletroforeses foram conduzidas a 20 mA por aproximadamente 5 h, tanto para a faseolina como para a fração solúvel em NaCl 0,5 M.

Após esta etapa, os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue R 250 (50% metanol; 0,125% Coomassie; 10% ácido acético), por um período de 12 h, então foram submetidos à solução de descoloração (10% metanol; 0,7%

ácido acético), para retirada do excesso de corante, e por fim fixados em solução fixadora (ácido acético 7%).

Os géis foram secados baseado no método de Popescu (1983), adaptado para secagem em bastidores, onde eram envolvidos entre duas folhas de papel celofane poroso, e esticados no bastidor, permanecendo assim por 24 h, aproximadamente.

3. 3. Análise Molecular

3. 3. 1. Extração de DNA

O DNA genômico, foi extraído de acordo com o procedimento descrito por Vilarinhos *et al.* (1994), com algumas adaptações para microextração em microcentrífuga. Inicialmente folhas jovens foram coletadas, logo em seguida pesados 200 mg, e maceradas em presença de nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para microtubos de 2 ml, onde foi adicionado 1 ml de tampão de extração (Tris-HCl 100mM pH 8,0; EDTA 50 mM pH 8,0; NaCl 1 M; 1,5% de CTAB; 1% de β -mercaptoetanol), e incubadas em banho-maria à temperatura de 65°C por 60 a 90 minutos aproximadamente, fazendo agitações suaves a cada 15 minutos. Para o processo de desproteinização, 600 μ l de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), foi adicionado ao tubo, realizando leves agitações por inversão, durante 5 minutos. Os microtubos foram centrifugados por 15 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e submetido à uma nova etapa de desproteinização com 900 μ l de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), sob a mesma condição anterior. Ao sobrenadante final, foi adicionado 2/3 de seu volume de isopropanol gelado, e os tubos deixados em freezer o tempo suficiente para a precipitação do DNA. A seguir, foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos, onde a fase aquosa foi removida, e o precipitado incubado com etanol 80% a 37°C por 20 minutos. Passada esta etapa, o DNA foi secado à vácuo e ressuspendido em 200 μ l de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) contendo RNase na concentração de 10 μ g/ml, e incubado a 37°C para a total dissolução do DNA. As amostras foram armazenadas a -80°C.

3. 3. 2. Dosagem do DNA em Espectrofotômetro

O DNA foi quantificado por leitura de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro, Sambrook *et al.*, (1989), utilizando uma alíquota de 10 µl de cada amostra diluída 100 vezes. A qualidade do DNA foi avaliada submetendo-se 10 µl da amostra à eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Após a avaliação as amostra foram diluídas em água ultrapura, em concentração para trabalho de 10ng/µl.

3. 3. 3. Amplificação do DNA via PCR pela Técnica RAPD

A PCR é caracterizada por um ciclo de 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla de DNA é desnaturada à aproximadamente 95°C, em seguida a temperatura cai em torno de 45°C, onde ocorre o anelamento de *primers*, e por final, há um novo aumento de temperatura para 72°C, permitindo que a enzima DNA polimerase sintetiza nova fita, pela adição de nucleotídeos. Este ciclo é repetido muitas vezes de forma à produzir o DNA alvo em progressão geométrica.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada de acordo com Williams *et al.* (1990), com algumas modificações. Foram testados 4 *primers* de sequência arbitrária com 10 pb de comprimento, da OPERON Technology (Tabela 2). Cada reação de amplificação continha: 1,5 unidade de Taq DNA polimerase, tampão de reação 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂), 100 mM de cada (dCTP, dATP, dGTP e dTTP), 8 pmoles de cada oligonuceotídeo (*primers*), e 20 ng de DNA genômico, completando com água ultrapura para um volume final de 25 µl.

As reações ocorreram em termociclador MJ Research INC, modelo PTC-100, programado para 3 ciclos iniciais de 94°C/1 min., 35°C/2 min. e 72°C/2 min., mais 34 ciclos 94°C/10 seg., 40°C/20 seg. e 72°C/2 min., com uma extensão final de 72°C/5 min., conforme descrito por Young & Kelly (1996).

Tabela 2. Sequência dos *primers* testados para análise de divergência genética entre *P. vulgaris* e *P. acutifolius*

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>
OPB-10	CTGCTGGGAC
OPB-11	GTAGACCCGT
OPB-18	CCACAGCAGT
OPS 11	AGTCGGGTGG

3. 3. 4. Eletroforese em Gel de Agarose e Visualização dos Fragmentos

Os produtos amplificados foram corados com brometo de etídeo (0,2 µg/ml), visualizados em transluminador de luz ultravioleta, e fotografados em ImageMaster-VDS. Como suporte para a separação das regiões amplificadas foi utilizado gel de agarose 1,2% e tampão de gel de eletroforese de TBE 0,5X (Tris-HCl, EDTA e ácido bórico), (SAMBROOK *et al.*, 1989). O tempo para a corrida eletroforética, foi de 2 a 3 h, até que as bandas estivessem nitidamente separadas no gel.

3. 4. Estudos de Ligações por Análise Bioquímica e Molecular

Por meio do padrão de segregação genética da progênie, uma matriz de dados foi analisada considerando presença e ausência de bandas. Para a caracterização dos grupos de ligação, e percentual da distância genética dos indivíduos, foi utilizado o programa Mapmaker e "Análise de Clusters".

4. RESULTADOS

4. 1. Faseolina

O perfil eletroforético da faseolina para os genitores Ica Pijão e GL-0441, não apresentou diferenças. Duas bandas de pesos moleculares 45.71 kDa e 40.10 kDa, foram identificadas em ambos. Os híbridos R_2C_1 , da mesma forma, obtiveram o mesmo padrão de bandas encontrado nos genitores (Figura 1).

4. 2. Proteínas Solúveis em NaCl 0,5 M

Dez bandas protéicas, obtidas pela eletroforese realizada em ambos genitores e híbridos, Ica Pijão (pai recorrente), GL-0441(pai doador), e R_2C_1 , foram analisadas quanto à presença e ausência de bandas. A presença de heterozigose foi detectada em apenas 2 bandas, as da lecitina, de 27 kDa e 23 kDa (Figura 2), com proporção de indivíduos heterozigotos de 7,69% (3 casos em 39). Em 7 bandas, os resultados apresentaram, uma proporção de 3:1, sendo 75% de característica homozigótica herdada do pai recorrente, Ica Pijão, e 25% de característica homozigótica herdada do pai doador (Figura 3). Em uma das bandas a de 33.4 kDa, houve segregação 3:1 com prevalência de bandas herdadas da cultivar GL-0441 (Figura 3).

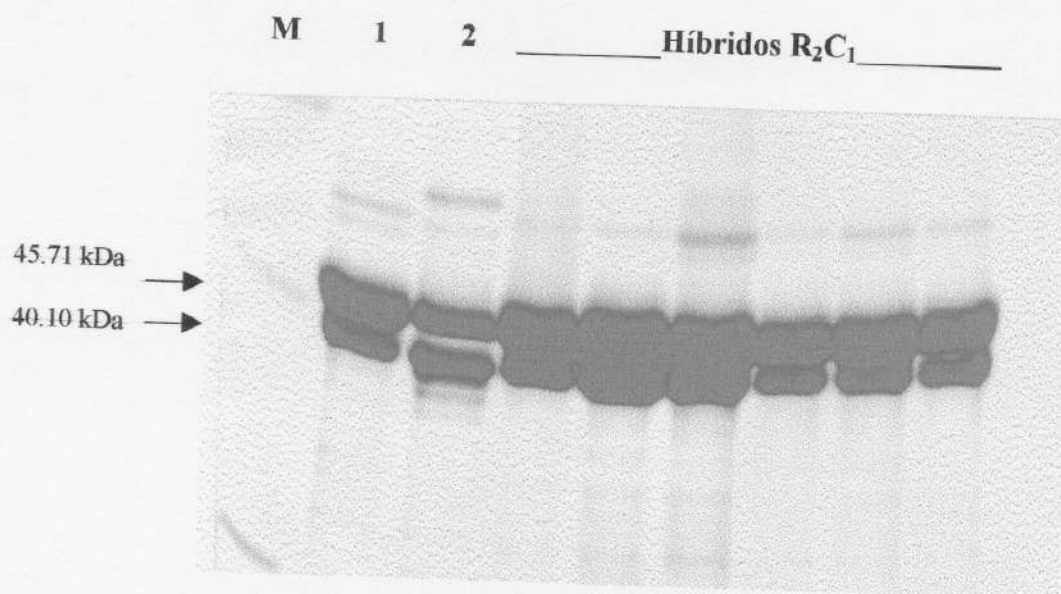


Fig 1. Eletroforese em SDS-PAGE 10% dos padrões de faseolina encontrados : (M) marcador 6H, (1) Ica Pijão (*P. vulgaris*); (2) GL-0441 (*P. acutifolius*) e Híbridos R_2C_1 : (10884, 10885, 10886, 10888, 10889, 10890).

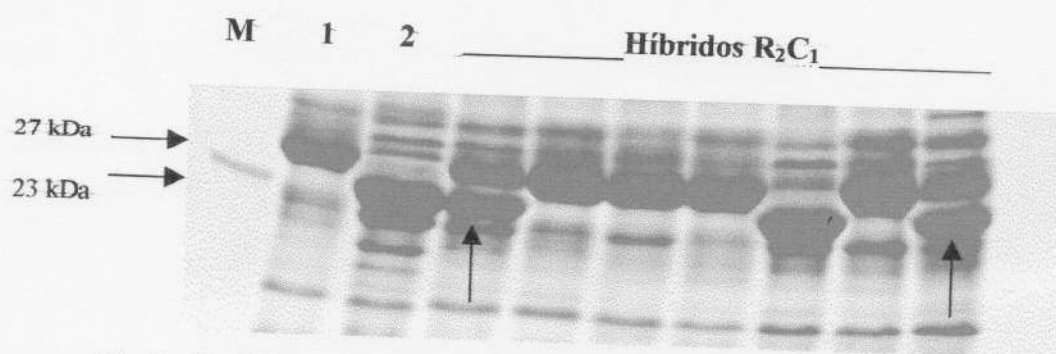


Fig 2. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% de proteínas solúveis em NaCl 0,5M, destacando a lecitina: (M) marcador 6H, (1) Ica Pijão (*P. vulgaris*); (2) GL-0441 (*P. acutifolius*), e Híbridos R_2C_1 : (10883, 10884, 10885, 10886, 10888, 10889, 10890). As setas indicam bandas em heterozigose nos indivíduos.

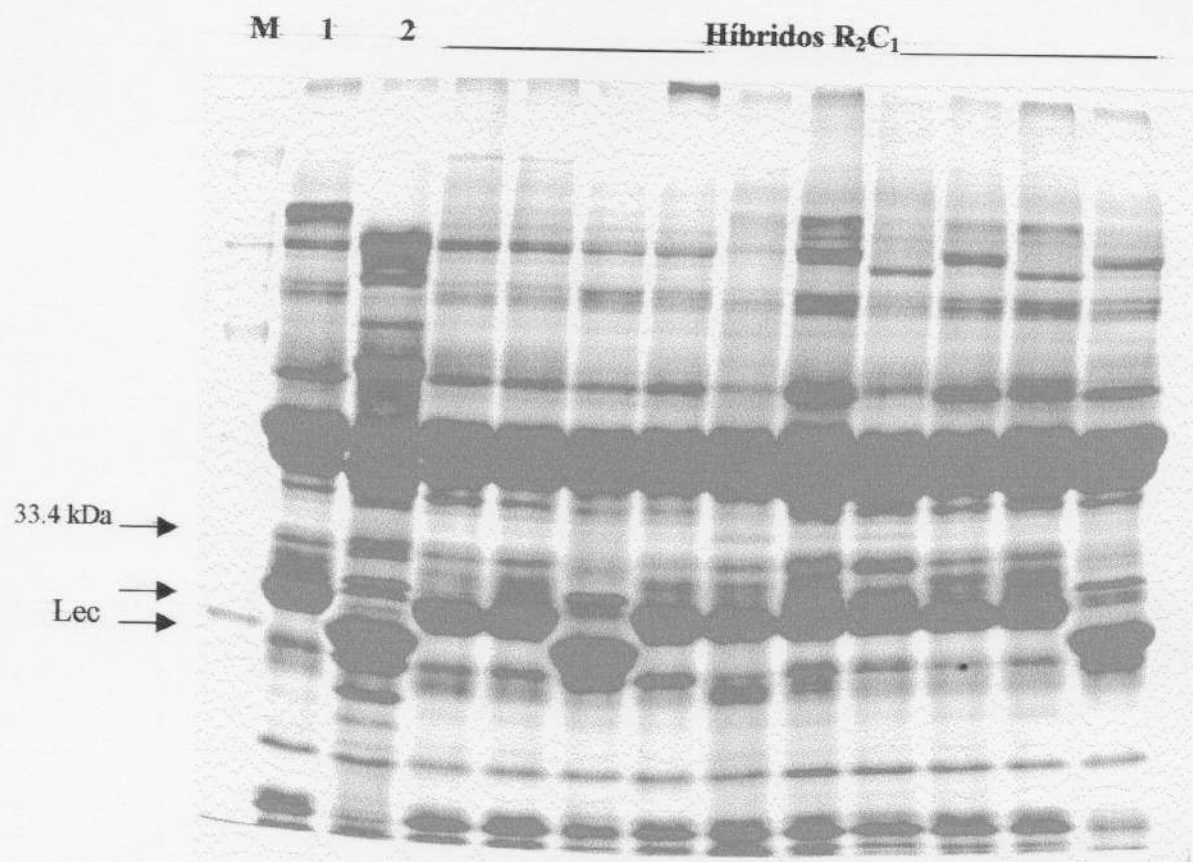


Fig 3. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% de proteínas solúveis em NaCl 0,5 M: (M) marcador 6H, (1) Ica Pijão (*P. vulgaris*); (2) GL-0441 (*P. acutifolius*) e Híbridos R₂C₁: (10869, 10871, 10872, 10874, 10875, 10877, 10878, 10880, 10881, 10882). As bandas sinalizadas pela seta apresentaram distribuição 3:1

4. 3. Marcadores Moleculares RAPD

Os quatro *primers* testados, geraram um total de cinco bandas polimórficas (Tabela 3), que foram avaliadas quanto a presença e ausência de bandas. Entre essas cinco, três são resultado de amplificação pelo OPB-10, uma pelo OPB-18 e uma pelo OPS-11. Das três bandas polimórficas geradas pelo OPB-10, uma (600 pb) apresentou segregação de 3:1 (29 bandas presentes para 10 ausentes), as outras duas bandas polimórficas geradas, 530 pb e 1230 pb, apresentaram segregação de 37:2 (presentes para ausentes) e 33:6 (ausentes para presentes), respectivamente (Figura 4).

Tabela 3. Totais de bandas amplificadas e polimórficas por *primer*

<i>Primer</i>	Bandas		
	Totais	Polimórficas	Tamanho pb
OPB-10	12	03	380-1800
OPB-11	12	00	320-2072
OPB-18	04	01	400-2000
OPS-11	08	01	300-1400

Outra banda à apresentar segregação polimórfica, foi a de 1000 pb gerada pelo *primer* OPS-11, com 31 presentes para 8 ausentes. O *primer* OPB-18, gerou banda polimórfica de 800 pb, na proporção de 33:6, presentes para ausentes.

Além das bandas polimórficas, foi constatado também bandas que estão presentes em todos os indivíduos R_2C_1 , e que estão presentes apenas no cultivar Ica Pijão, geradas pelos *primers* OPB-10 e 11 (Figuras 4 e 5), e OPS-11. Caso semelhante não foi encontrado para a cultivar GL-0441, exceto se essa banda estiver presente em ambos genitores.

Bandas aparentemente não encontradas nos genitores foram constatadas nos híbridos R_2C_1 , em amplicação pelo *primer* OPB-11 (Figura 5).

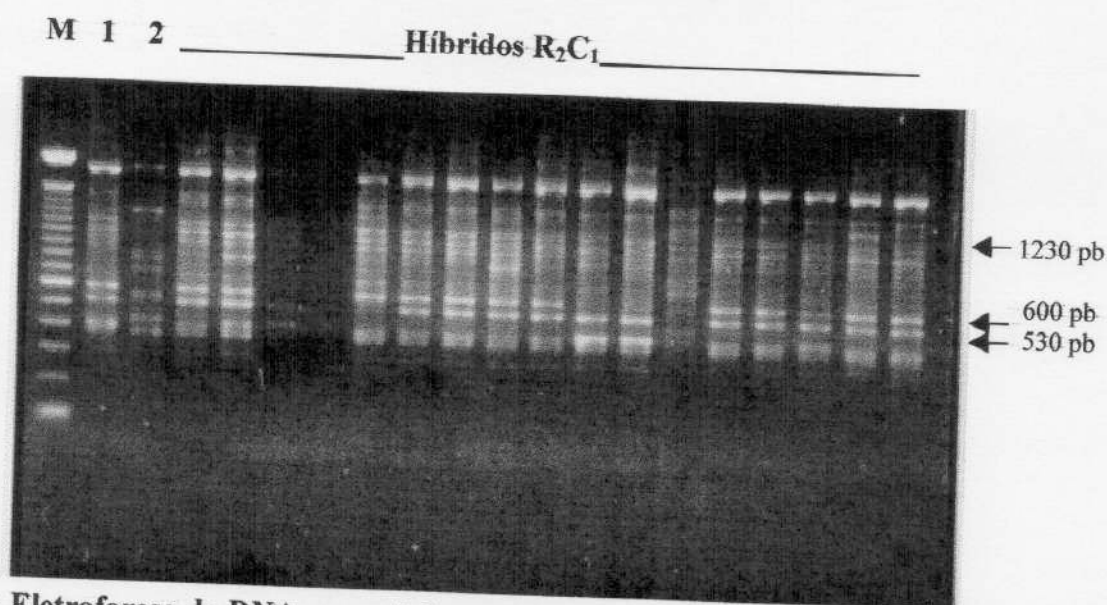


Fig. 4. Eletroforese de DNA, em gel de agarose 1,2%. *primer OPB-10.* (M) marcador molecular 100 pb; (1) Ica Pijão (*P. vulgaris*); (2) GL-0441 (*P. acutifolius*) e Híbridos R_2C_1 : (3262, 3267, 3272, 3277, 3282, 3287, 3292, 3297, 3302, 3307, 3312, 10858, 10859, 10860, 10861, 10862, 10863).

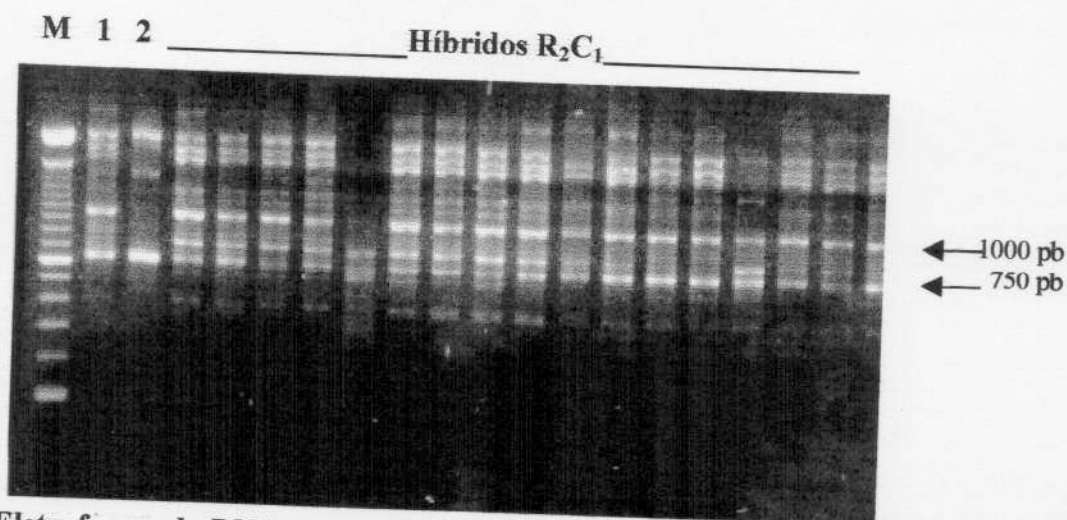


Fig. 5. Eletroforese de DNA em gel de agarose 1,2%. *Primer OPB-11.* (M) Marcador Molecular 100 pb; (1) Ica Pijão (*P. vulgaris*); (2) GL-0441 (*P. acutifolius*), e Híbridos R_2C_1 : (3262, 3267, 3272, 3277, 3282, 3287, 3292, 3297, 3302, 3307, 3312, 10858, 10859, 10860, 10861, 10862, 10863)

4. 4. Estudos de Ligação

Todas as bandas polimórficas obtidas de DNA e proteínas, foram lançadas em uma matriz baseada na presença e ausência de bandas, e então analisados no programa Mapmaker, versão 3.0, para estudos de ligação. Foi então obtido dois grupos de ligação, um maior composto pelos marcadores 27 kDa, 34kDa, 33.4 kDa, OPB-10b, OPB-10a e OPS-11, totalizando 125,5 cM, e outro menor formado pelos marcadores 23 kDa, 29 kDa, 28 kDa e 31.4 kDa, totalizando 32.2 cM. Quatro marcadores 121 kDa, 63.6 kDa, 65 kDa e OPB-10c não apresentaram ligação (Figura 6). No maior grupo, 33.4 kDa e o OPB-10b, representam um ligação formada por um marcador de proteína e outro de DNA, separados por 21.8 cM.

A maior distância entre os marcadores foi de 31.9 cM, e a menor de 10.4 cM.

4. 5. Distâncias Genéticas

A estimativa das distâncias genéticas envolvendo genitores e progênes R_2C_1 , realizada pelo programa de estatística, distinguiu dois *clusters*, distantes em 65%, sendo um maior ao qual pertence a cultivar Ica Pijão com 29 indivíduos, e outro menor com a cultivar GL-0441, com 12 indivíduos. As proporções em número de indivíduos aproxima-se de 3:1 (Figura 7). Dentro do *cluster* do GL-0441, há ainda outra subdivisão, separando este em dois menores *clusters* distanciados por uma distância genética de 47%. O indivíduo mais próximo do GL-0441 é o 3262, distanciados em 17%. As distâncias genéticas entre os indivíduos do menor *cluster* são maiores que as distâncias genéticas entre os indivíduos do maior *cluster*.

No *cluster* ao qual pertence a cultivar Ica Pijão, verifica-se menores distâncias genéticas entre seus indivíduos, sendo que a maior distância observada foi de 31%. Os indivíduos mais próximos da cultivar Ica Pijão, 10880, 10874, 10871 e 3267, distanciam-se dele em 7%, e são praticamente idênticos molecularmente, de acordo com os marcadores estudados.

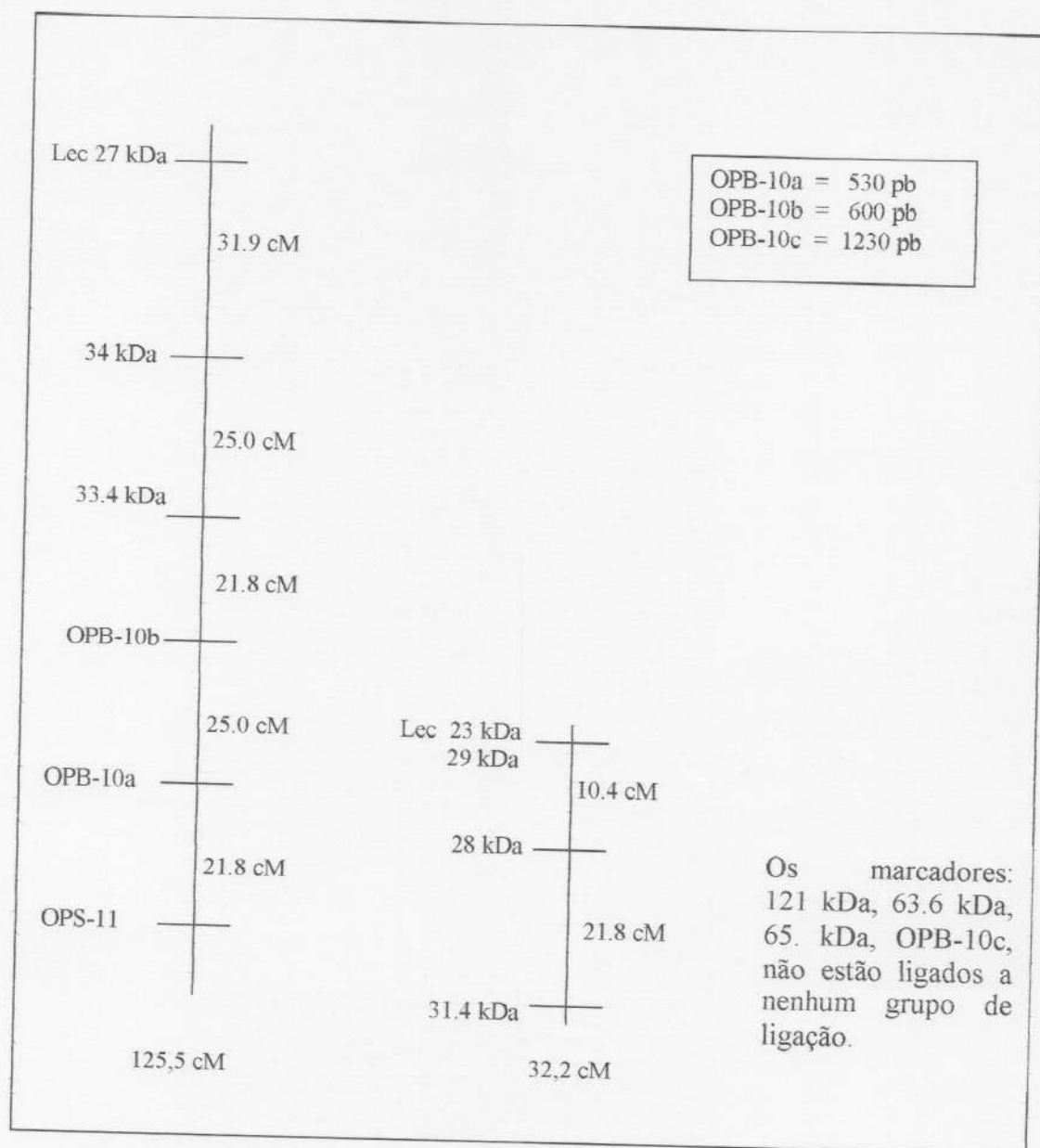


Fig 6. Mapa de ligação construído a partir dos marcadores bioquímicos e moleculares, de híbridos R_2C_1 de *P. vulgaris* e *P. acutifolius*.

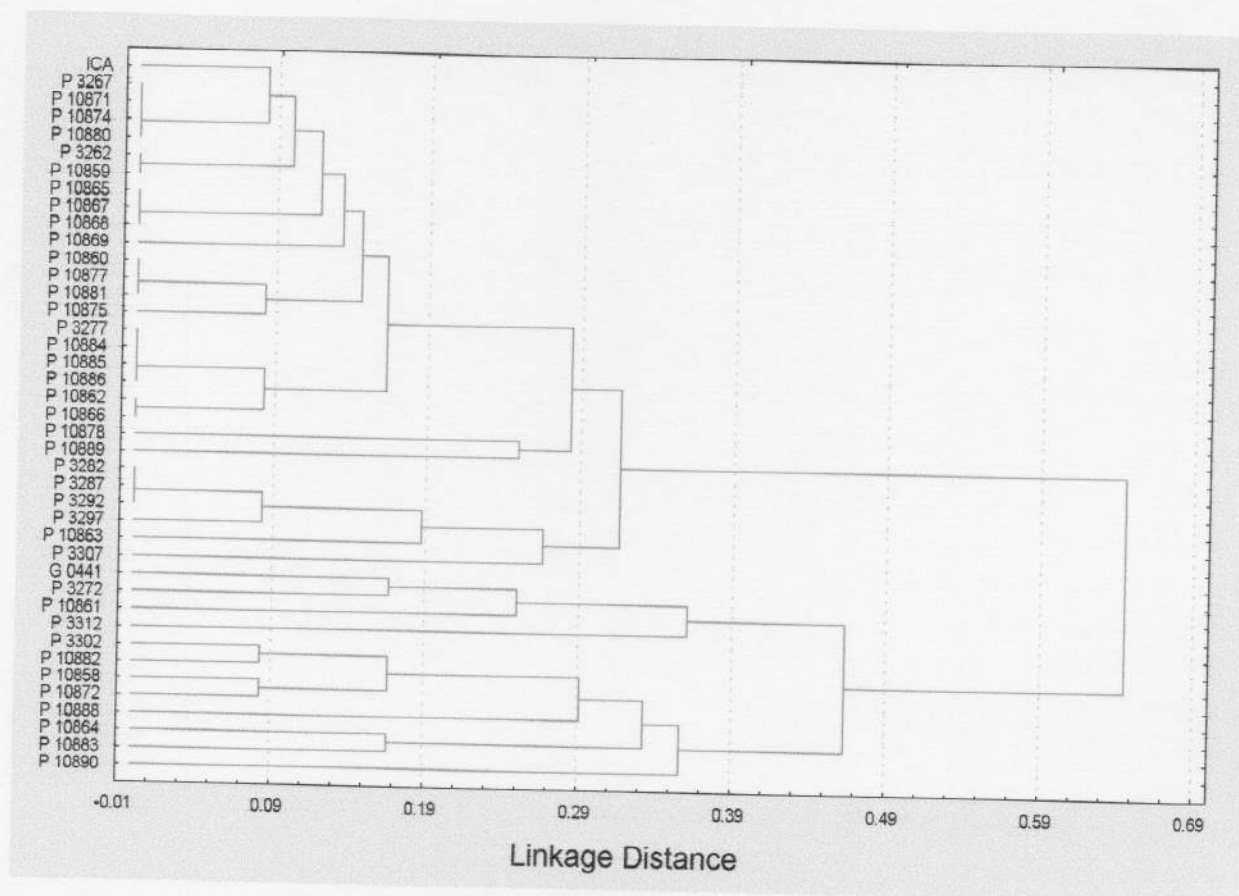


Fig 7. Diagrama da distância genética entre *P. vulgaris*, *P. acutifolis* e híbridos R_2C_1 .

5. DISCUSSÕES

5. 1. Faseolina

A faseolina é uma proteína extremamente conservada, e está diretamente relacionada com o centro de origem da espécie (MA, & BLISS, 1978). A análise do perfil eletroforético de faseolina não indicou diferenças entre as duas espécies, provavelmente devido a origem comum, mesoamericana de ambas (VIEIRA, 1967). Esta hipótese é reforçada, pelo comportamento dessa herança obtido na progênie, onde pode-se verificar que todos os indivíduos apresentam padrão idêntico ao dos genitores (Figura 1).

5. 2. Proteínas Solúveis em NaCl 0,5 M

Estima-se que no retrocruzamento com o pai recorrente Ica Pijão, aproximadamente 87,5% do genoma já esteja presente na progênie R_2C_1 , e a proporção de indivíduos homozigotos para heterozigotos deve ser de 3:1 (Figura 8). A característica em homozigose herdada pelos híbridos deve pertencer ao genitor recorrente.

As análises das 10 bandas protéicas estudadas, neste trabalho, revelou que a segregação dos genes para essas bandas estão seguindo uma proporção de 3:1, sendo 75% de características homozigotas herdadas do genitor recorrente, e 25%

de características homozigóticas herdadas do genitor doador (Figura 7). A ocorrência de indivíduos heterozigotos, foi constatada em apenas duas das dez bandas analisadas (27 kDa e 23 kDa), as da lecitina, com frequência na progênie baixa (7,69%), não correspondendo com o esperado de 25% de heterozigose, por banda analisada.

À estes resultados, muitas hipóteses tentam explicar, a ocorrência dessas bandas homozigóticas do genitor doador, e a não ocorrência de bandas heterozigóticas. Embora entre espécies próximas, a hibridação interespecífica já traz no próprio termo que diferenças genéticas deverão ser superadas para o sucesso do cruzamento. Barreiras a nível de cromossomos e genes, são esperadas, devido à divergências genéticas ocorridas durante o processo de evolução de ambas espécies. As principais espécies de plantas cultivadas hibridizam facilmente com espécies geneticamente mais próximas dela (KNOTT, 1987). Porém a substituição do segmento cromossômico da espécie receptora por um segmento cromossômico de outra espécie afim pode resultar em duplicações, em deleções ou em associações gênica indesejáveis, esses efeitos são, particularmente, maiores em espécies diplóides (PRESTES & GOULART, 1985).

A substituição total de um cromossomo do *P. vulgaris* por um do *P. acutifolius* pode ter ocorrido, originando assim bandas homozigóticas do *P. acutifolius*, entre os indivíduos da progênie.

Outro fator a se considerar, é a supressão cromossômica, demonstrada por Gustafson & Ross (1990), onde a expressão gênica pode ser parcial ou totalmente inibida, dependendo do genoma para o qual os genes foram transferidos. Esta supressão pode estar ocorrendo quando em heterozigose, o cromossomo ou a região cromossômica do *P. acutifolius*, suprime o cromossomo ou a região cromossômica do *P. vulgaris*, expressando apenas seu produto de transcrição.

Todas as possíveis hipóteses que justifiquem a falta de correlação entre as frequências esperadas e as observadas, estão baseadas em problemas surgidos durante o processo meiótico.

Estes desarranjos estão apoiados na mistura de genomas parcialmente homólogos, que comumente resultam em complexas interações gênicas e cromossômicas.

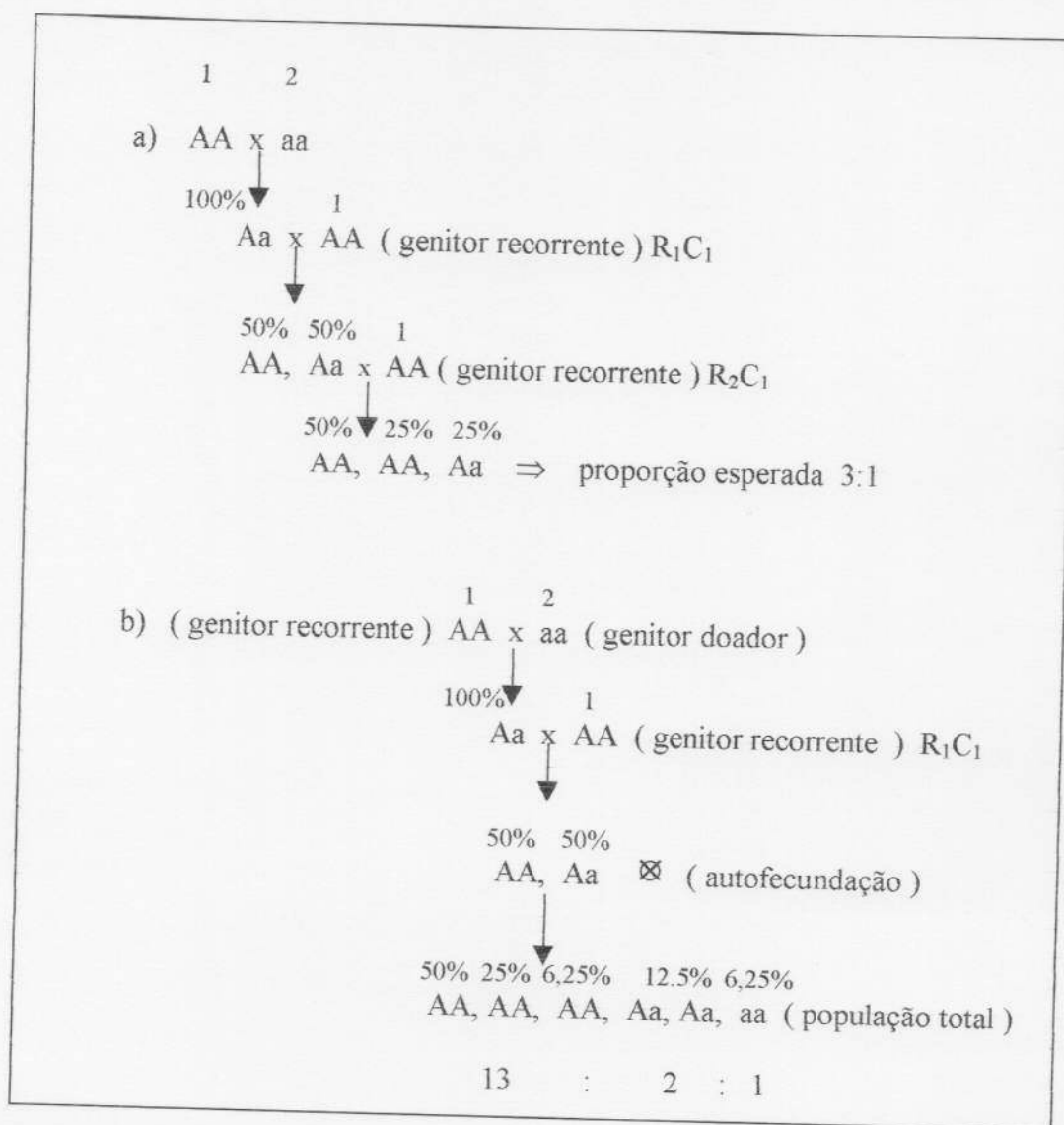


Fig. 8 Esquema do retrocruzamento R_2C_1 , a) e esquema de retrocruzamento seguido de autofecundação no R_1C_1 , b)

Além das possíveis falhas de estrutura cromossômica e sua expressão em indivíduos da progênie, pode-se considerar a hipótese da contaminação por pólen nos indivíduos R_1C_1 , neste caso uma possível autofecundação justificaria o aparecimento de indivíduos homozigotos para características da cultivar GL-0441 (Figura 8). Se considerar este caso, a proporção esperada seria no mínimo 13:2:1 de bandas homozigóticas Ica Pijão : heterozigotos : homozigotos GL-0441 (Figura 8). Entretanto, deveria também haver indivíduos heterozigotos, o que não está ocorrendo, com frequência normal.

5. 3. Marcadores Moleculares RAPD

Os marcadores moleculares apresentam uma característica única que os separa dos marcadores bioquímicos, eles não identificam o indivíduo heterozigoto, devido ao reconhecimento de apenas uma das fitas pelo *primer*. Portanto os indivíduos que possuem duas cópias de um alelo não são distinguidos quantitativamente, daqueles que contém apenas uma cópia. Seguindo esse raciocínio, os produtos de amplificação dos indivíduos devem apresentar apenas uma banda única para todos, já que um dos alelos não será reconhecido pelo *primer*. Os resultados novamente não estão de acordo com o esperado, pois o polimorfismo de bandas entre os indivíduos da progênie foi constatado. O *primer* OPB-10, gerou 3 bandas polimórficas nas regiões de 530, 600 e 1230 pb (figura 5). Duas bandas, de 530 e 600 pb, que estão presentes apenas na cultivar Ica Pijão, foram herdadas pela progênie de forma polimórfica. Então, o polimorfismo dessas duas bandas, pode ser explicado por possíveis mutações gênicas ou cromossômicas ocorridas na região de anelamento do *primer*. Essas mutações, são provavelmente geradas durante o processo meiótico. A banda polimórfica de 1230 pb, presente apenas na cultivar GL-0441, foi herdada por dois indivíduos da progênie (Figura 5), o que não deveria mais acontecer. Esses dados condizem com os resultados do gel de proteínas, só que no caso dos marcadores moleculares o locus derivado da cultivar GL-0441 é interpretado como uma ausência de bandas.

O *primer* OPB-11, apresentou em sua amplificação presença de bandas polimórficas de 750 pb na progênie, que não se apresentaram nos genitores (Figura 6). Explicações como, o efeito somatório de bandas mais fracas (pouco

amplificadas) localizadas nessa mesma região em ambos genitores, ou a amplificação parcial da banda mais forte de 630 pb do *P. acutifolius* durante o processo de amplificação, podem ser consideradas. Entretanto, a assimetria de pareamento durante o primeiro cruzamento, e transmissão desta para as progênie, é uma hipótese muito significativa, já que mais de 80% dos indivíduos possuem a banda.

As bandas polimórficas obtidas pelos *primers* OPB-18 (950 pb) e OPS-11 (1000 pb) apresentaram também segregações com presença de polimorfismo entre os indivíduos da progênie, variando apenas nas proporções obtidas de 33:6 e 31:8, respectivamente, pouco significativas com a frequência mínima de 15:1, se considerando a autofecundação em todos os indivíduos, o que seria quase impossível de acontecer (Figura 8).

Nos quatro *primers* analisados foi encontrado bandas, presentes em toda a progênie, que só se manifestaram no cultivar Ica Pijão, entretanto a condição contrária não foi constatada, este fato é relacionado com a maior proporção de genoma da cultivar Ica Pijão, na progênie.

Assim como sugerido para as proteínas a ocorrência de desvios não esperados, provavelmente está relacionado com as incompatibilidades dos genomas.

5. 4. Estudos de Ligação

O mapa de ligação para *P. vulgaris* é pouco desenvolvido, e o que se tem consiste de pequenos números de ligação que incluem genes controlando a maioria das características (BASSET, 1991).

Apesar da quantidade relativamente baixa de marcadores, dois grupos de ligação puderam ser delimitados. O maior grupo tem uma característica destacada em relação ao segundo, neste grupo foi possível, estabelecer uma ligação entre um marcador de proteínas e um de DNA, separados pela distância de 21.8 cM. Pelo mapa foi possível constatar a presença de recombinantes. Todos os marcadores obtidos quando adicionados a um maior número de informações, sejam eles,

moleculares, bioquímicos ou morfológicos, podem tornar-se importantes associado a uma característica de interesse.

A identificação de marcadores originados a partir de cruzamentos interespecíficos pode contribuir na escolha do material, na condução do programa, e no direcionamento dos objetivos. Mapas de ligação por marcadores moleculares torna possível localizar e manipular fatores genéticos individuais associados a características complexas (Tanksley *et. al.*, 1993). O acréscimo de marcadores bioquímicos, moleculares e morfológicos ao mapa, são fundamentais para o enriquecimento de informações a respeito da dinâmica destes cruzamentos.

5. 5. Distâncias Genéticas

O diagrama das distâncias genéticas envolvendo as cultivares Ica Pijão e GL-0441, e os híbridos R_2C_1 , apresenta a frequência genômica de 3:1, em R_2C_1 (Figura 7), contudo o esperado é de 87,5% : 12,5%. Esta diferença para a frequência esperada provavelmente se deve à instabilidade meiótica dos cromossomos e a baixa taxa de recombinações, seguidas por recombinações genômicas deletérias. Pelo diagrama é possível observar as grandes distâncias que separam os híbridos agrupados com GL-0441, já que durante dois cruzamentos genoma *P. vulgaris* foi acrescentado, diminuindo a proporção do genoma do *P. acutifolius*, e aumentando a uniformidade entre os componentes do seu *cluster*. O híbrido 3272, foi o que apresentou uma menor distância genética com o cultivar GL-0441, isso quer dizer que no processo de seleção, esse híbrido é o que mais se distancia da cultivar Ica Pijão.

O grupo formado junto à cultivar Ica Pijão, o que reteve maior número de indivíduos devido às semelhanças genéticas, destaca-se de grande importância para a finalidade do produto esperado de retrocruzamentos. Neste *cluster*, os indivíduos 3267, 10871, 10874 e 10880 não apresentam diferenças genéticas, e estão distantes 7% da cultivar Ica Pijão. Esses indivíduos são os principais na escolha do melhor genótipo, pois são os que mais possuem menor distâncias genéticas de acordo com os marcadores utilizados. Tanksley e Rick (1988) em estudos com

tomate relataram que a proporção de progenitor recorrente obtida na primeira geração de retrocruzamentos, após a seleção de um marcador em cada um dos cromossomos, equivale aproximadamente à proporção obtida em três gerações de retrocruzamentos na ausência de seleção.

Resta então, apenas testar esses indivíduos para avaliar se eles herdaram ou não a característica de interesse inserida no primeiro cruzamento. Caso apresentem, serão ótimos candidatos a serem lançados como novas cultivares.

6. CONCLUSÕES

Existe a possibilidade da ocorrência de autofecundação acidental, entretanto, interações complexas, como supressão gênica ou cromossômica provavelmente estão ocorrendo.

Foi confirmada a presença de recombinação gênica entre *P. vulgaris* e *P. acutifolius*, formando dois grupos de ligação de 125,5 cM e 32,2 cM.

A frequência esperada em retrocruzamentos pós introgressão de parte do genoma de espécies exóticas como *P. acutifolius*, não é observada indicando grande instabilidade meiótica, baixa taxa de recombinação e combinações genômicas deletérias.

Os genótipos que estão geneticamente mais próximos da cultivar recorrente de acordo com os marcadores moleculares obtidos se apresentam com 7% de distância genética.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASSET, M.J.. A revised linkage map of common bean. **HortScience** **26**:834-836. 1991.
- BECKMANN, J.S. & SOLLER, M.. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement: methodologies, mapping and costs. **Theor. Appl. Genet.** **67**:35-43. 1983.
- BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: ed. UFV p. 357-379; 434-459. 1997.
- BURKART, A.. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. 2ª ed.. Buenos Aires. **Acme Agency**, p. 569. 1952.
- CIAT. Reserch constraints provisionally identified by CIAT. **Workshop on advanced Phaseolus beans research network**. Set.11-14. Cali, Colombia. 1990.
- CROCOMO, O.J., & CABRAL, J.B.. Interspecific hybridization in *Phaseolus*: embryo axis culture. In: CROCOMO, O.J., TAVARES, F.C.A., EVANS, D.A., SHARP, W.R., BRAVO, J.E. & PADDOCK, E.F.. **Biotechnology of Plants and Microorganisms**. Columbs, The Ohio State University Press.1985.

- ECHEVERRIGARAY, S.; CARVALHO, M.T.V.; POMPEU, A.S. & DERBYSHIRE, E. Affinity grouping of closely related lines of dry beans (*P. vulgaris* L.) through comparative eletrophoresis of seed proteins. **Ver. Bras. Genet.** **16** (3): 759-771.1993.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D.. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p. Cap. 1: Classes de marcadores moleculares para análise genética, p. 40-70. Cap. 2: Aplicações de marcadores moleculares na genética e melhoramento de plantas, p. 74-118. 1996.
- GOULART, L.R.. **Barley Yellow Dwarf Virus Resistance of Wheatgrass: Molecular and immunological Evaluation ans Introgression into Wheat**. Indian-E.U.A. Purdue University. (Tese de Ph.D). 1990.
- GOU, M., MOK, W.S., & MOK, M.C. Isozyme Banding Patterns and Embryo Development in Interespecific Crosses of *Phaseolus*. **J. Hered.** **80**: 29-32. 1989.
- GUSTAFSON, J.P. & ROSS, K. Control of alien gene expression for aluminum toxity in weat. **Genome** **33**: 9-12. 1990.
- KNOTT, D.R. Transferring alien genes to weat. *In*: HEYNE, E.G. **Wheat and wheat improvement**. 2^a ed. Madison, WI. American Society of Agronomy. P.462-471. 1987.
- LAEMMLI, U.K.. Cleavage of strutcural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680-685. 1970.
- MA, Y. & BLISS, F.A.. Seed proteins of common bean. **Crop science** **18**: 431-437.1978.

- MEJÍA-JIMÉNEZ, A., MUNHOZ, C., JACOBSEN, H.J., ROCA, W.M., & SINGH, S.P. Interspecific hybridization between common tepary beans: increased hybrid embryo growth, fertility, and efficiency of hybridization through recurrent and congruit backcrossing. **Theor. Appl. Genet.** **88**: 324-331. 1994.
- POPESCU, O.. A simple method for drying polyacrilamide slabs gels using glycerol and gelatin. **Electrophoresis** **4**: 432-435. 1983.
- PRESTES, A.M. & GOULART, L.R.. Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Vol.3. Passo Fundo-RS. 430 p. p.315-364. 1985.
- ROMERO, J.; SUN, S.M.; McLESTER, R.C.; BLISS, F.A. e HALL, T.C. Heritable variation in a polypeptide of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiol.** **56**:776-779. 1975.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York, Vol. 3. 2nd. edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p E5-E7. 1989.
- SMARTT, J.. Interspecific hybridization between cultivated american species of the genus *Phaseolus*. **Euphytica** **19**:480-489. 1970.
- TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H. & BONIERBALE, M.W.. RFLP mapping in plant breeding: new tools na old science. **Bio Technology** **7**: 257-264. 1993.
- TANKSLEY, S.D. & RICK, C.M. Isozymic gene linkage map of the tomato; applications in genetics and breeding. **Theor. Appl. Genet.** **57**: 811-823. 1988.
- TEIXEIRA, S.M. & ROCHA, L.S.A.. Análise sócio-econômica da produção. In: ZIMMERMANN, M.J.O., ROCHA, M. & YAMADA, T. **Cultura do feijoeiro**:

- fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 589p. p.37. 1988.
- THOMAS, C.V. & WAINES, J.G.. Fertile backcross and allotetraploid plants from crosses between tepary beans and common beans. **The J. hered.** **75**: 93-98. 1984.
- THORMANN, C.E.; FERREIRA, M.E.; CAMARGO, L.E.A.; TIVANG, J.G. & OSBORN, T.C. Comparison of genetic relationship estimates among cruciferous species based on RFLP and RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.** **85**: 976-984. 1993.
- TINGEY, S.V., RAFALSKI, J.A. & WILLIAMS, J.G.K.. Genetic analysis with RAPD markers. **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**. P.3-8. 1992.
- VIEIRA, C. **O Feijoeiro-Comum**. Viçosa; ed. Imprensa Universitária; p.9-30. 1967.
- VIEIRA, E.H.N. Produção e tecnologia. In: ZIMMERMANN, M.J.O., ROCHA, M. & YAMADA, T. **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 589p. p.57 – 62. 1988.
- VIEIRA, G.S. **Controle genético da resistência à mancha angular e mapeamento de caracteres importantes no feijoeiro comum**. Uberlândia. Universidade Federal de Uberlândia. (Tese de Mestrado). 1997.
- VILARINHOS, A.D., BARROS, E.G., PAIVA, E., SEDIYAMA, C.S. & MORREIRA, M.A. Use of the random amplified polymorphic DNA technique to characterize soybean (*Glycine max* L. Merrill) genotypes. **Rev. Bras. Genet.** **17**: 287-290. 1994.

- ZIMMERMANN, M.J.O. & TEIXEIRA, M.G.. Origem e Evolução. In: ZIMMERMANN, M.J.O., ROCHA, M. & YAMADA, T. **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 589p. p.79-86.1988.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.K.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** **18**:6531-6535. 1990.
- YOUNG, R.A. & KELLY, J.D. RAPD markers flanking the are gene for anthracnose resistance in common bean. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** **121(1)**: 37-41.1996.

	OPB- 10a	OPB- 10b	OPB- 10c	OPB- 18	OPS- 11	121 kDa	27 kDa	23 kDa	29 kDa	28 kDa	31,4 kDa	34 kDa	63,6 kDa	65 kDa	33,4 kDa
I-PIJÃO	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
GI-0441	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
3262	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
3267	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
3272	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
3277				+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
3282	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
3287	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
3292	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
3297	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
3302	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
3307	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3312	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
10858	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
10859	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
10860	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
10861	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
10862	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
10863	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
10864	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10865	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
10866	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
10867	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
10868	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
10869	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
10871	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
10872	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
10874	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
10875	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
10877	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
10878	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
10880	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
10881	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
10882	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
10883	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
10884	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
10885	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
10886	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
10888	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
10889	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
10890	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+

Relação com os 5 marcadores moleculares e 10 marcadores bioquímicos obtidos com *P. vulgaris*, *P. acutifolius* e Híbridos R₂C₁. (presença de bandas “+”; ausência de bandas “-”), as não ampliações estão representadas pelo espaço em branco.